



隋娟娟, 曹兴, 梅少迅, 成仪型, 马慧新. 百合花药水通道蛋白 *LoPIP2;6* 基因克隆、亚细胞定位与表达[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(02): 72-79.
SUI Juanjuan, CAO Xing, MEI Shaoxun, CHENG Yixing, MA Huixin. Cloning, subcellular localization and expression analysis of aquaporin *LoPIP2;6* gene of lily anther[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(02): 72-79.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.02.07

百合花药水通道蛋白 *LoPIP2;6* 基因克隆、亚细胞定位与表达

隋娟娟¹ 曹兴² 梅少迅¹ 成仪型¹ 马慧新¹

(1. 阜阳师范大学 生物与食品工程学院/抗衰老中草药安徽省工程技术研究中心, 安徽 阜阳 236037;
2. 烟台大学 建筑学院, 山东 烟台 264005)

摘要 为进一步探究水通道蛋白 PIP2 亚家族成员在花药发育及开裂过程中发挥的作用, 以百合花药为试验材料, 利用同源克隆法获得 *LoPIP2;6* 基因, 采用 DNAMAN、MEGA 软件对蛋白结构和系统进化树进行分析, 利用烟草瞬时表达检测亚细胞定位, 通过实时荧光定量 PCR 检测基因表达。结果表明: *LoPIP2;6* 基因开放阅读框有 849 bp, 编码 282 个氨基酸, 为疏水性蛋白, 含有 6 个典型的跨膜螺旋结构域及 2 个 NPA 基序, 与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*)、铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 的亲缘关系最近; *LoPIP2;6* 蛋白亚细胞定位于质膜和內质网上; *LoPIP2;6* 基因在花药发育处于四分体时期表达量最高, 其次为独立小孢子时期。综上, 推测 *LoPIP2;6* 可能在花药发育前期细胞增长、花药发育后期药室隔膜与裂口细胞的水分转移过程中发挥作用, 研究结果为进一步探究水通道蛋白调控百合花药发育及开裂提供了理论参考。

关键词 百合; 花药; *LoPIP2;6*; 基因表达

中图分类号 S682.2+9

文章编号 1007-4333(2025)02-0072-08

文献标志码 A

Cloning, subcellular localization and expression analysis of aquaporin *LoPIP2;6* gene of lily anther

SUI Juanjuan¹, CAO Xing², MEI Shaoxun¹, CHENG Yixing¹, MA Huixin¹

(1. College of Biology and Food Engineering/Engineering Technology Research Center of Anti-Aging Chinese Herbal Medicine, Fuyang Normal University, Fuyang 236037, China;
2. College of Architecture, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract In order to further explore the role of members of the PIP2 subfamily of aquaporins in anther development and dehiscence, lily anthers were taken as experimental materials. The *LoPIP2;6* gene was obtained from lily anthers using homologous cloning method. Protein structure and evolutionary tree analysis were conducted using DNAMAN and MEGA software. Subcellular localization was detected using tobacco transient expression, and gene expression was detected using real-time fluorescence quantitative PCR. The results were as follows: The open reading frame of *LoPIP2;6* gene contained 849 bp encoding 282 amino acids. The *LoPIP2;6* was a hydrophobic protein that contained 6 typical transmembrane helical domains and 2 NPA motifs. *LoPIP2;6* protein had closer relationship with *Phalaenopsis equestris* and *Dendrobium catenatum*, and the protein was localized to the plasma membrane and endoplasmic reticulum. The *LoPIP2;6* gene displayed the highest expression level at the tetrad stage, followed by the independent microspore stage. It was speculated that *LoPIP2;6* might play a role in the cell growth during

收稿日期: 2024-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902047); 安徽省自然科学基金项目(2008085MC79); 阜阳师范大学教科研项目(2021JYXMSZ06, 2022KCSZSF01)

第一作者: 隋娟娟(ORCID: 0000-0002-5855-1791), 教授, 主要从事园林植物栽培生理与生物技术研究, E-mail: suijuanjuan@163.com

the early stage of anther development, as well as in the water transfer of anther connective tissue and crack zone cells during the late stage. In conclusion, this study provides a theoretical reference for further exploring the regulation of lily anther development and dehiscence by aquaporins.

Keywords lily; anther; LoPIP2;6; gene expression

花是被子植物的生殖器官,一朵完整的花通常包括花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊4部分^[1]。雄蕊由花药和花丝组成,花药位于花丝顶端,是花粉产生、发育以及成熟的场所^[1]。多数被子植物的花药包含4个花粉囊(少数植物2个),左右对称,花粉囊壁有表皮层、内壁层(纤维层)、中层和绒毡层,其中内部称为药室^[1]。花粉成熟后,开裂散粉是花药发育的最后阶段,时间短暂但过程复杂。花药发育后期,药室内壁次生壁增厚,相邻2个花粉囊之间药室隔膜发生降解,同侧花粉囊连通成为一个药室,花粉囊之间的裂口组织开裂形成裂缝区,药室向外弯曲,花药由此开裂,花粉散出^[1-2]。

花药不同组织脱水是导致花药开裂的原因之一,正确的脱水时间对花粉发育和花药开裂十分重要。水通道蛋白AQP(Aquaporins)是一种位于细胞膜上的内在蛋白质,能够根据细胞膜内外渗透压调节水分运移,调控花药脱水,影响花药开裂^[3]。植物水通道蛋白AQP家族根据氨基酸序列和膜定位情况分为5个亚家族,分别为质膜内在蛋白(Plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、X内在蛋白(X intrinsic proteins, XIPs)、类Nod26膜内在蛋白(Nodulin 26-like intrinsic proteins, NIPs)、液泡膜内在蛋白(Tonoplast membrane intrinsic proteins, TIPs)以及小分子碱性膜内在蛋白(Small and basic intrinsic proteins, SIPs)^[4]。其中PIPs和TIPs主要为水通道蛋白,PIPs负责细胞水分的吸收与排出,TIPs负责调节液泡膨压,NIPs主要介导矿物质离子以及甘油等小分子的进出,SIPs则是植物水通道蛋白中的最小家族成员,能够运输水分及其他小分子^[5-6]。目前已经从水稻^[7]、玉米^[8]、小麦^[3]、油菜^[9]等多种植物中克隆得到水通道蛋白,并进行了功能预测和验证。

PIPs是水通道蛋白中最大的亚家族蛋白,以四聚体的形式存在细胞膜上,控制水分进出,维持细胞水分平衡,参与植物的多项生理活动,如根系水分运输、细胞水分运输、干种子吸水吸胀以及非生物胁迫响应等^[10-14]。研究表明,在高等植物中,PIPs亚家族均含有高度保守的结构域,分别为位于E环

的TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VFWF/YN和位于C环的GGGANXXXXGY,根据C-端和N-端的不同,将PIPs亚家族成员又分为PIP1和PIP2这2个亚类^[15]。PIP1亚类蛋白通常包括较长的N端和较短的C端,而PIP2亚类蛋白具有较短的N端和较长的C端,能够在胞质外环延伸多个氨基酸^[15]。烟草花药中的研究发现NtPIP1、NtPIP2表达时期虽然有重叠,但表达模式存在差异^[16-17]。NtPIP1和NtPIP2在花药发育前期均能检测到表达,但在环形细胞簇中只有NtPIP1表达;而在花药发育后期,NtPIP1表达下降,NtPIP2则表达强烈,NtPIP2基因RNAi植株花药组织表现脱水减缓,花药开裂延迟^[16-17]。

百合(*Lilium* spp.)是百合科百合属球根花卉,是全球非常受欢迎的鲜切花之一。然而,目前市场流通的单瓣百合品种,如:‘西伯利亚’‘索邦’等,由于花药较大,散出的花粉较多,会造成花瓣和周围环境不同程度的污染,给日常使用带来不便。本研究拟从‘西伯利亚’百合花药中克隆得到水通道蛋白基因LoPIP2;6,对其编码的蛋白进行生物信息学分析、亚细胞定位分析、基因表达分析以及蛋白功能初步预测,旨在为今后通过基因工程手段调控百合花药发育和开裂提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为东方百合‘西伯利亚’(Siberia)。百合开始现蕾时依次取样,将花药从花蕾中取出,液氮速冻并放置于-80℃超低温冰箱保存备用。其中花蕾长度间隔(1±0.2)cm,直至花朵开放。同时将同时期花药进行石蜡包埋,以备后续切片试验使用;取百合根、茎、叶和鳞茎进行液氮速冻并保存于-80℃超低温冰箱,以备后续试验使用。

试验中用到的相关酶类购自TaKaRa公司,感受态DH5α细胞购自全式金生物公司,RNA提取试剂盒购自Tiangen公司,其他试剂为实验室常规试剂药品。引物由北京新时代众合科技公司合成,测序由北京擎科生物公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 石蜡切片制作及观察

参考 Sanders 等^[2]方法对花药进行固定、脱水、浸蜡和包埋,使用上海徕卡石蜡切片机进行花药组织切片(8 μm),采用番红-固绿染色法进行染色,封片后的切片于光学显微镜(Nikon Eclipse E100)下进行观察并拍照保存。

1.2.2 RNA提取及LoPIP2;6基因克隆

以百合花药为试验材料,按照RNA提取试剂盒说明书进行总RNA提取,使用Reverse Transcriptase M-MLV将RNA进行反转录,获得cDNA。从测定的转录组数据中筛选出LoPIP2;6基因序列,设计2条特异引物LoPIP2;6F1: ATGTCTAAGGAGGTGAACACACCGCCG, LoPIP2;6R1: TCAATTATGAGGGTTGCTCCG-GAACGAG。以cDNA为模板,以LoPIP2;6F1、LoPIP2;6R1为引物,使用高保真酶(PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase)进行PCR扩增(95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min)。扩增产物用凝胶电泳检测,目的条带切胶回收并连接至载体pMD18-T,随后转化到DH5 α 感受态细胞, Amp抗性固体培养基过夜培养;挑取单克隆进行PCR检测,并将阳性克隆送至公司测序。

1.2.3 LoPIP2;6蛋白结构及系统进化树分析

利用在线网站<http://web.expasy.org/protparam>预测LoPIP2;6蛋白分子式、分子量和等电点等;利用在线网站<http://smart.embl-heidelberg.de/>与https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html进行LoPIP2;6蛋白二级结构预测。利用DNAMAN进行蛋白同源比对,使用MEGA5.0进行LoPIP2;6蛋白系统进化树构建和分析。

1.2.4 LoPIP2;6亚细胞定位及基因表达分析

利用Golden gate无缝克隆方法将LoPIP2;6融合到pBWA(V)HS-*osgfp*载体,所用引物为LoPIP2;6F2: ACGGCATGGACGAGCTCTACAT-GTCTAAGGAGGTGAACACACCGC, LoPIP2;6R2: TGAAGACAGAGCTAGTTACATCAAT-TATGAGGGTTGCTCCGGAACG,将构建好的载体质粒通过电转化法转入农杆菌(GV3101)。培养并收集含有载体质粒的农杆菌液,用0.01 mol/L MgCl_2 重悬后用1 mL注射器将其注射于烟草叶片

下表皮,弱光培养2 d;置于激光共聚焦显微镜(Nikon C2-ER)下观察拍照,共定位时将含有内质网Marker质粒的农杆菌一起悬浮操作。

从百合根、茎、叶、鳞茎和花药中提取RNA并进行反转录,利用实时荧光定量PCR仪进行LoPIP2;6基因表达检测,内参为18S RNA(18SF: AGTTGGTGGAGCGATTTGTCTG, 18SR: CCT-GTTATTGCCTCAAACCTTCC),特异引物为LoPIP2;6F3: GCGGAGATTATCGGCACTT, LoPIP2;6R3: CCAGATGCACCACAAACACT。3个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 百合花药结构组织观察

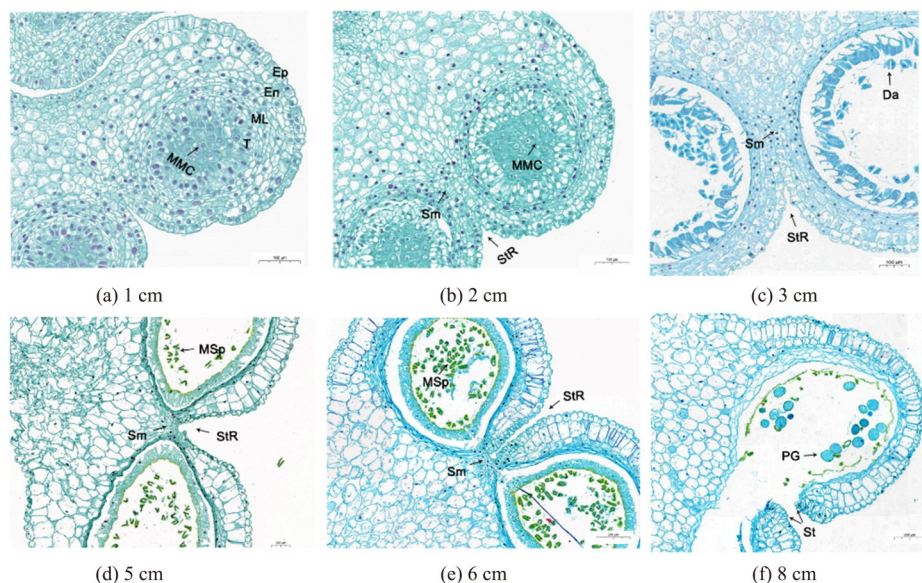
为了进一步观察百合花药发育过程,从1~8 cm(间隔1 cm)百合花蕾中取出花药进行组织切片观察(横切)。1~2 cm花蕾中的花药已经分化出比较明显的表皮、内壁层、中层与绒毡层,但药室内细胞仍处于花粉母细胞状态(图1(a)和(b));4 cm花蕾中的花药处于减数分裂状态,药室内出现了二分体和四分体(图1(c));5~6 cm花蕾中的花药二分体和四分体已经发育为独立小孢子,此时2个花粉囊之间的隔膜组织细胞排列紧密(图1(d)和(e));8 cm花蕾中的花药药室内,小孢子逐渐发育成为饱满的花粉粒,此时花粉囊之间的隔膜消失,2个药室相互连通,裂口区开裂,为后续散粉做好准备(图1(f))。

2.2 百合LoPIP2;6基因克隆

以百合花药为试验材料提取总RNA,并反转为cDNA第1链。根据转录组数据中筛选出的百合LoPIP2;6基因核苷酸序列,设计上、下游扩增引物,以反转录的cDNA为模板,进行LoPIP2;6基因ORF(开放阅读框)全长扩增。最终获得校正之后的ORF全长共849 bp,编码282个氨基酸(图2)。

2.3 百合LoPIP2;6蛋白性质及结构域分析

通过在线软件分析发现LoPIP2;6的分子式为 $\text{C}_{1393}\text{H}_{2140}\text{N}_{364}\text{O}_{368}\text{S}_8$,分子量为33.84 ku,理论等电点(pI)为9.02(>7),总亲水性平均系数(GRAVY)为0.417,总负电荷残基(天冬氨酸、谷氨酸)为15,正电荷残基(赖氨酸、精氨酸)为20,推测LoPIP2;6属于碱性、疏水性蛋白;LoPIP2;6蛋白中含有34.04%的 α 螺旋、2.84%的 β -转角、19.50%的延



MMC:小孢子母细胞;Ep:表皮;En:内壁;ML:中层;T:绒毡层;Sm:隔膜;Da:二分体;StR:裂口区;MSp:小孢子;St:裂口;PG:花粉粒。
MMC, microspore mother cells; Ep, epidermis; En, endothecium; ML, middle layer; T, tapetum; Sm, septum; Da, dyad; StR, stomium region; MSp, microspores; St, stomium; PG, pollen grains.

图1 不同长度百合花蕾的花药横切图

Fig. 1 Anther cross sections from lily buds of different lengths

```

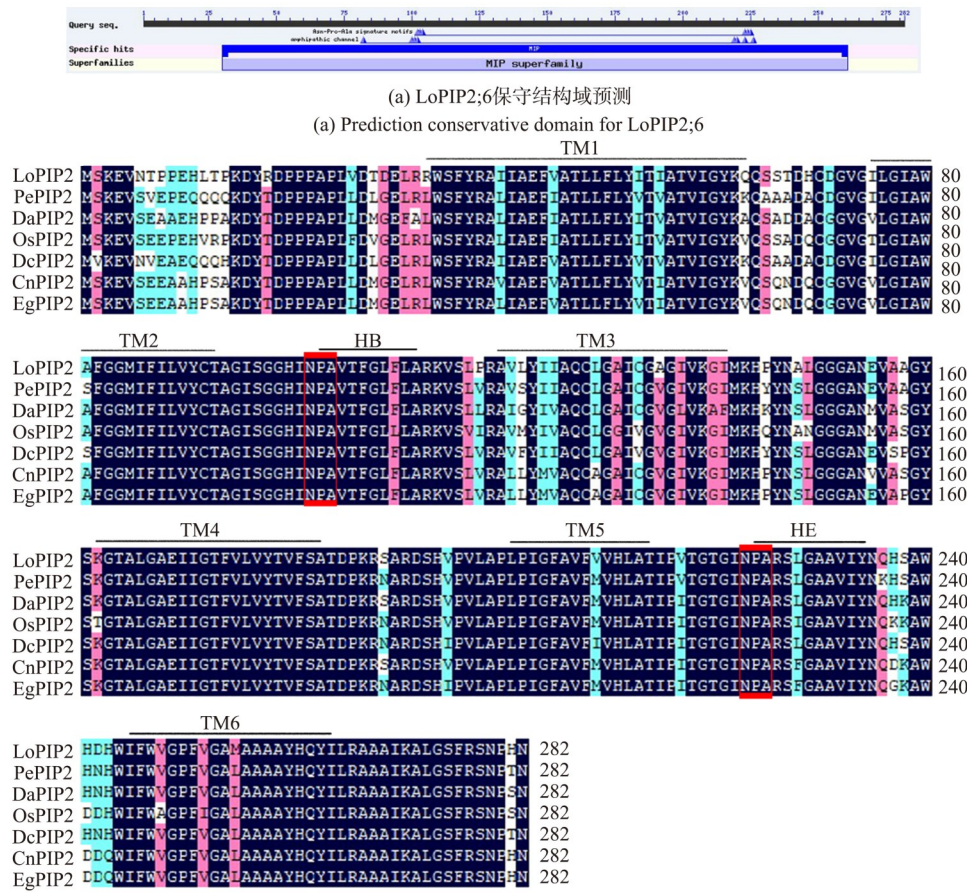
ATG TCT AAG GAG GTG AAC ACA CCG CCG GAG CAC CTG ACA CCC AAG GAC TAC
M S K E V N T P P E H L T P K D Y
AGA GAC CCA CCT CCC GCT CCT CTC GTC GAC ACC GAC GAG CTC CGC CGC TGG
R D P P P A P L V D T D E L R R W
TCC TTC TAC CGC GCC ATC ATC GCG GAG TTC GTC GCC ACC CTC CTC TTC CTC TAC
S F Y R A I I A E F V A T L L F L Y
ATC ACC ATC GCC ACA GTC ATC GGC TAC AAA CAA CAG TCC TCT ACC GAC CAC TGC
I T I A T V I G Y K Q Q S S T D H C
GAC GGC GTC GGC ATC CTC GGC ATC GCC TGG GCC TTC GGA GGC ATG ATC TTC ATC
D G V G I L G I A W A F G G M I F I
CTC GTC TAC TGC ACC GCC GGA ATA TCA GGC GGT CAC ATC AAC CCT GCA GTC ACC
L V Y C T A G I S G G H I N P A V T
TTC GGC CTC TTC CTC GCC AGA AAA GTC TCA CTT CCT CGC GCC GTC CTC TAC ATC
F G L F L A R K V S L P R A V L Y I
ATC GCC CAG TGC CTC GGC GCC ATA TGT GGC GCA GGC ATT GTG AAG GGG ATCATG
I A Q C L G A I C G A G I V K G I M
AAG CAC CCG TAC AAC GCC CTC GGC GGC GGG GCC AAT GAG GTG GCG GCA GGG
K H P Y N A L G G G A N E V A A G
TAC AGC AAA GGA ACC GCC CTC GGT GCG GAG ATT ATC GGC ACT TTT GTG CTT GTC
Y S K G T A L G A E I I G T F V L V
TAC ACT GTT TTT TCA GCA ACC GAC CCT AAA CGC AGC GCT CGA GAC TCG CAT GTG
Y T V F S A T D P K R S A R D S H V
CCG GTG CTG GCG CCG CTG CCG ATC GGG TTT GCA GTG TTT GTG GTG CAT CTG
P V L A P L P I G F A V F V V H L
GCG ACC ATA CCG GTT ACC GGA ACA GGG ATT AAT CCG GCC AGG AGT TTG GGG
A T I P V T G T G I N P A R S L G
GCG GCG GTC ATA TAT AAC CAG CAC AGC GCC TGG CAT GAT CAT TGG ATA TTT TGG
A A V I Y N Q H S A W H D H W I F W
GTC GGG CCG TTT GTT GGG GCG ATG GCG GCA GCG GCG TAC CAC CAG TAT ATA CTG
V G P F V G A M A A A A Y H Q Y I L
AGG GCG GCG ATC AAG GCT CTG GGC TCG TTC CGG AGC AAC CCT CAT AAT
R A A A I K A L G S F R S N P H N
TGA

```

图2 百合 *LoPIP2;6* 基因核苷酸与氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of *LoPIP2;6* and its amino acid sequence

伸链和43.62%的无规则卷曲。对LoPIP2;6蛋白进行结构域分析发现,LoPIP2;6蛋白在30~261位是保守的MIP结构域(图3(a)),与其他物种的PIP2蛋白一样存在6个典型的跨膜螺旋结构域(TM1~TM6)、2个半螺旋结构(HB、HE)以及2个位于半螺旋结构上的NPA基序(图3(b))。



(b) LoPIP2;6与其他物种PIP2氨基酸序列对比

(b) The amino acid sequence homology alignment of LoPIP2;6 and PIP2 from other plants

LoPIP2;百合;PePIP2;小兰屿蝴蝶兰(XP_020581951.1);DaPIP2;参薯(KAH7663251.1);OsPIP2;水稻(NP_001389274.1);DcPIP2;铁皮石斛(XP_020702890.1);CnPIP2;椰子(KAG1354163.1);EgPIP2;油棕(XP_010920097.1);TM:跨膜螺旋;HB:半螺旋B;HE:半螺旋E;红框:NPA基序。

LoPIP2,*Lilium* spp.;PePIP2,*Phalaenopsis equestris*(XP_020581951.1);DaPIP2,*Dioscorea alata*(KAH7663251.1);OsPIP2,*Oryza sativa*(NP_001389274.1);DcPIP2,*Dendrobium catenatum*(XP_020702890.1);CnPIP2,*Cocos nucifera*(KAG1354163.1);EgPIP2,*Elaeis guineensis*(XP_010920097.1);TM,transmembrane helices;HB,half helices B;HE,half helices E;Red box,NPA domains.

图3 百合LoPIP2;6生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis for LoPIP2;6 of lily

2.4 百合LoPIP2;6蛋白系统进化树分析

将百合LoPIP2;6氨基酸序列在NCBI网站进行Blast分析,结果发现百合LoPIP2;6与小兰屿蝴蝶兰PIP2;6氨基酸相似度最高,达到88.30%。将百合LoPIP2;6与均为单子叶植物的小兰屿蝴蝶兰、铁皮石斛、椰子(*Cocos nucifera*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、康藏嵩草(*Carex littledalei*)、小果野蕉(*Musa acuminata*)等进行系统进化分析,发现百合

LoPIP2;6与小兰屿蝴蝶兰和铁皮石斛的亲缘关系较近(图4)。

2.5 百合LoPIP2;6蛋白亚细胞定位分析

将构建好的载体质粒农杆菌注射到烟草叶片中,弱光培养2d后,置于激光共聚焦显微镜下观察。结果显示,空载对照pBWA(V)HS-osgfp的绿色荧光分布在细胞核、细胞质和细胞膜中(图5(a));而含有pBWA(V)HS-osgfp-pip2;6重组载

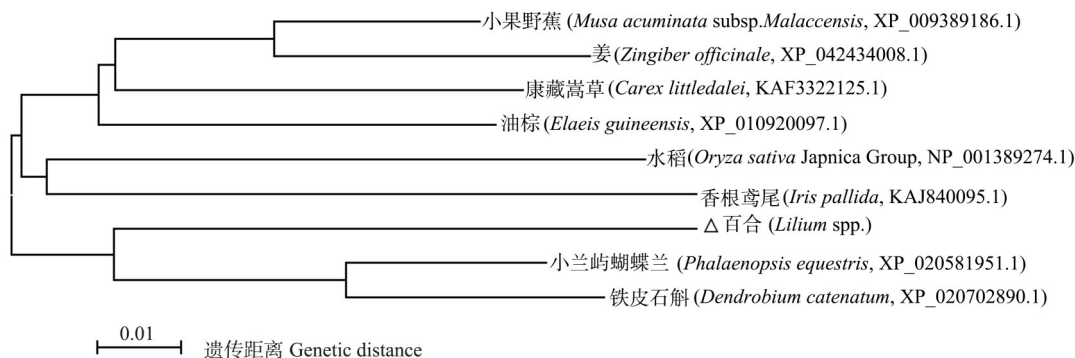


图 4 百合 *LoPIP2;6* 与其他物种蛋白系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of PIP2;6 from lily and other species

体的烟草叶片细胞内,绿色荧光不仅在质膜上有分布,在细胞内还有明显的颗粒状聚集,由此推测 *LoPIP2;6* 蛋白在内质网也有分布(图 5(b))。将

其与内质网定位信号的荧光蛋白(pBWA(V)HS-ER-Mkate)进行共定位,进一步确认了推测结果(图 5(b))。

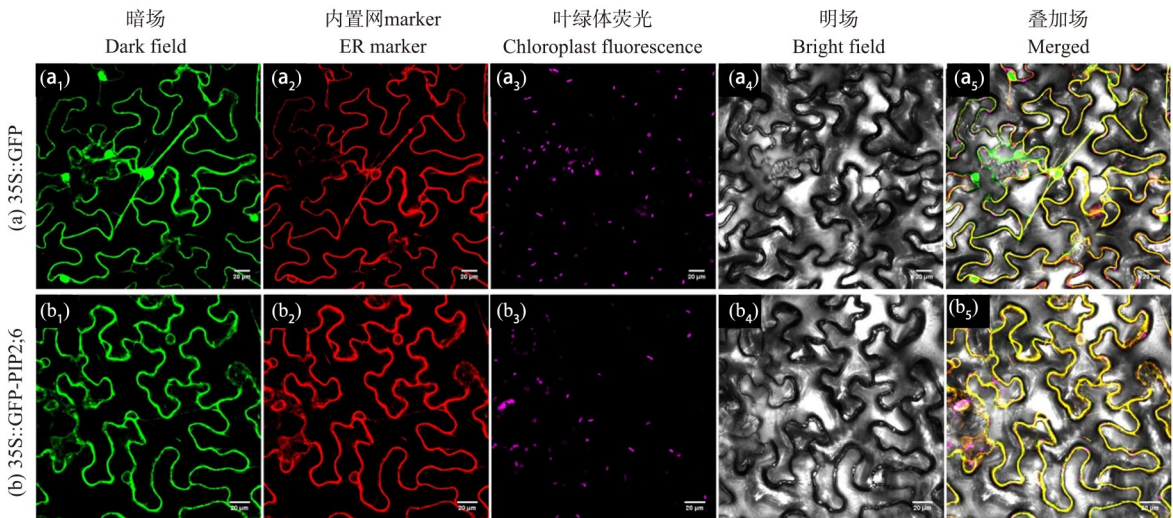


图 5 百合 *LoPIP2;6* 在烟草叶片中的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of *LoPIP2;6* in tobacco leaf cells

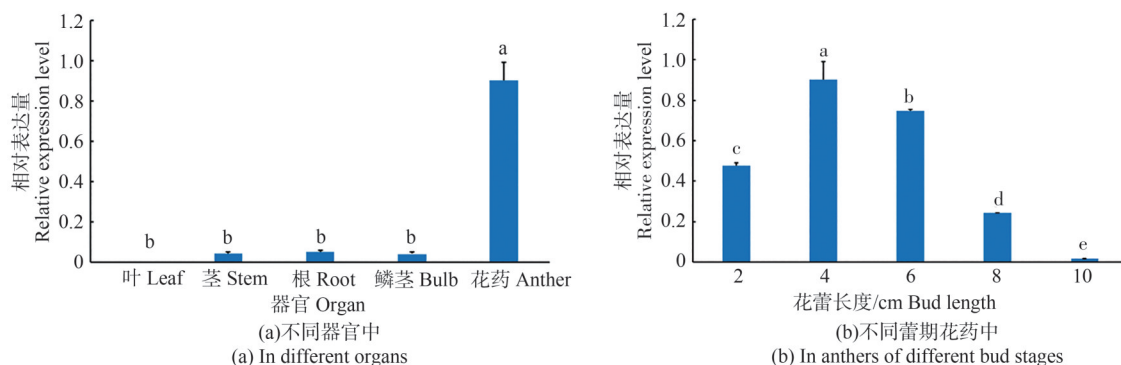
2.6 百合 *LoPIP2;6* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 法,对百合的根、茎、叶、鳞茎以及花药进行了 *LoPIP2;6* 表达检测(图 6(a))。*LoPIP2;6* 基因在百合花药(4 cm 花蕾)中的相对表达量最高,在叶片中的相对表达量最低。为进一步探索 *LoPIP2;6* 基因在花药不同发育阶段中的表达情况,分别取 2、4、6、8 和 10 cm 花蕾中的花药进行检测(图 6(b)),*LoPIP2;6* 基因表达呈现先上升后下降的趋势,在 4 cm 花蕾的花药中表达量最高;随着花药的进一步发育,*LoPIP2;6* 基因的相对表达量逐渐降低。结合切片观察结果(图 1)推测

LoPIP2;6 可能在百合花药小孢子细胞增大,以及花药开裂前隔膜细胞、裂口细胞的水分转移过程中发挥作用。

3 讨论与结论

Bots 等^[16-17]研究发现,烟草 *NtPIP2* 基因 RNAi 植株表现花药开裂延迟;Tong 等^[18]在百合中沉默 PIP2 亚家族基因,能阻碍花药脱水干燥,减缓花药开裂。鉴于此,本研究对百合花药不同发育时期转录组数据进行了筛选,获得百合 *PIP2;6* 基因 ORF 序列,通过 PCR 技术进行克隆,将其命名为 *LoPIP2;6*。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图6 百合 *LoPIP2;6* 基因的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *LoPIP2;6* gene in lily

本研究发现 *LoPIP2;6* 蛋白结构与橡胶树^[19]、香蕉^[20]等植物中的 PIP2 亚家族蛋白结构相似,均含有 AQP 家族蛋白保守的 MIP 结构域、典型的 6 个跨膜结构域、2 个半螺旋结构以及 2 个 NPA 基序,属于碱性、疏水性蛋白。邹智等^[19]在橡胶树、侯晓婉等^[20]在香蕉中的研究发现 HbPIP2;3、MaPIP2;2 亚细胞定位在细胞膜上。而本研究发现 *LoPIP2;6* 不仅在细胞膜上有分布,在细胞内也有明显的颗粒状聚集。为此进行了内质网 Marker 共定位,进一步确认 *LoPIP2;6* 同时也定位在内质网上,与水稻 OsPIP2;6 的亚细胞定位结果一致^[21]。在西番莲 (*Passiflora edulia* Sims) 的研究中发现,高温、高盐、低温和干旱胁迫均能诱导 *PePIP2* 基因的表达, *PePIP2* 基因在根中的表达量较高^[13]。而在本研究中百合 *LoPIP2;6* 在花药中呈现较高的表达量,在叶片中的表达量比较低,说明在该时期 *LoPIP2;6* 主要在花药发育过程中发挥作用,该基因是否也能够响应非生物胁迫,在百合抗逆方面发挥功能,仍需要进一步研究。

烟草花药发育第 2 阶段,在大多数类型的细胞中都能检测到 *NtPIP2* 基因表达, *NtPIP2* 参与了花药发育前期细胞生长过程中的水分调控^[16-17]。本研究发现, *LoPIP2;6* 基因在 4 cm 花蕾的花药中相对表达量最高,而在此时期花药发育处于二分体、四分体时期,生长处于旺盛阶段,推测百合 *LoPIP2;6* 基因与烟草 *NtPIP2* 基因功能类似,在花药发育前期细胞增大、药室隔膜生长过程中发挥水分调节作用。Tong 等^[18]研究发现百合 PIP2 亚家族成员 *LoPIP2* 在花药发育的各个阶段均能检测到表达,但

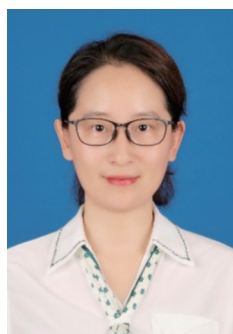
在花药开裂后表达下调。本研究中 *LoPIP2;6* 基因的表达趋势与 Tong 等^[18]研究基本一致,花药裂口区开裂前表达量较高,随后逐渐下降,推测 *LoPIP2;6* 在花药开裂前参与了脱水过程。根据以上结果推测如果在百合中将 *LoPIP2;6* 基因沉默,可能会导致花药发育异常,延迟花药开裂。本研究为进一步研究百合水通道蛋白 *LoPIP2;6* 的功能提供了一定的理论基础,也为通过基因工程手段改良百合花粉污染问题提供了参考基因。

参考文献 References

- [1] Goldberg R B, Beals T P, Sanders P M. Anther development: Basic principles and practical applications [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(10): 1217-1229
- [2] Sanders P M, Bui A Q, Weterings K, McIntire K N, Hsu Y C, Lee P Y, Truong M T, Beals T P, Goldberg R B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1999, 11(6): 297-322
- [3] 谭照国, 苑少华, 李艳梅, 白建芳, 岳洁茹, 刘子涵, 张天豹, 赵福永, 赵昌平, 许本波, 张胜全, 庞斌双, 张立平. 小麦 *TaPIPI* 基因克隆及其在花药开裂中潜在功能分析 [J]. 作物学报, 2022, 48(9): 2242-2254
Tan Z G, Yuan S H, Li Y M, Bai J F, Yue J R, Liu Z H, Zhang T B, Zhao F Y, Zhao C P, Xu B B, Zhang S Q, Pang B S, Zhang L P. Cloning of *TaPIPI* gene and its potential function in anther dehiscence in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(9): 2242-2254 (in Chinese)
- [4] Chaumont F, Moshelion M, Daniels M J. Regulation of plant aquaporin activity [J]. *Biology of the Cell*, 2005, 97(10): 749-764
- [5] Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato M H, Maeshima M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(25): 5814-5820
- [6] Fotiadis D, Jenö P, Mini T, Wirtz S, Müller S A, Frayssé L, Kjellbom P, Engel A. Structural characterization of two aquaporins isolated from

- native spinach leaf plasma membranes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(3): 1707-1714
- [7] Liu C W, Fukumoto T, Matsumoto T, Gena P, Frascaria D, Kaneko T, Katsuhara M, Zhong S H, Sun X L, Zhu Y M, Iwasaki I, Ding X D, Calamita G, Kitagawa Y. Aquaporin OsPIP1; 1 promotes rice salt resistance and seed germination[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 63:151-158
- [8] Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels M J, Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(3): 1206-1215
- [9] Yuan D, Li W, Hua Y P, King G J, Xu F S, Shi L. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family and transcriptional responses to boron deficiency in *Brassica napus* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1336
- [10] Zou Z, Gong J, Huang Q X, Mo Y Y, Yang L F, Xie G S. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in *Castor bean* (*Ricinus communis* L.) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0141022
- [11] Ding X, Iwasaki I, Kitagawa Y. Overexpression of a lily *PIP1* gene in tobacco increased the osmotic water permeability of leaf cells[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2004, 27(2):177-186
- [12] Schuurmans J A M J, van Dongen J T, Rutjens B P W, Boonman A, Pieterse C M J, Borstlap A C. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 53(5):655-667
- [13] 敖茂宏, 马伏宁, 彭杨, 黄东梅, 邢文婷, 吴斌, 许奕. 西番莲水通道蛋白 *PePIP2* 基因克隆及表达分析[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(1):17-25
- Ao M H, Ma F N, Peng Y, Huang D M, Xing W T, Wu B, Xu Y. Cloning and expression analysis of *PePIP2* gene from *Passiflora edulis* Sims [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(1): 17-25 (in Chinese)
- [14] Yang X M, Li J W, Ji C C, Wei Z X, Zhao T, Pang Q Y. Overexpression of an aquaporin gene *EsPIP1; 4* enhances abiotic stress tolerance and promotes flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 193:25-35
- [15] Kammerloher W, Fischer U, Piechottka G P, Schäffner A R. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system [J]. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 1994, 6(2):187-199
- [16] Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, Mariani T. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(409):113-121
- [17] Bots M, Vergeldt F, Wolters-Arts M, Weterings K, van As H, Mariani C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(3):1049-1056
- [18] Tong Z, Li Q H, Yang Y J, Dai F W, Gao J P, Hong B. Isolation and expression analysis of *LoPIP2*, a lily (*Lilium Oriental Hybrids*) aquaporin gene involved in desiccation-induced anther dehiscence [J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 164:316-322
- [19] 邹智, 郑玉蛟, 乔雪莹, 阳江华. 橡胶树水通道蛋白HbPIP2;7的亚细胞定位与多聚化分析 [J]. *西南林业大学学报:自然科学*, 2024, 44(1):1-6
- Zou Z, Zheng Y J, Qiao X Y, Yang J H. Subcellular localization and multimerization analyses of HbPIP2; 7, a PIP aquaporin from *Hevea brasiliensis* [J]. *Journal of Southwest Forestry University: Natural Sciences*, 2024, 44(1):1-6 (in Chinese)
- [20] 侯晓婉, 胡伟, 颜彦, 徐碧玉, 金志强. 香蕉 *MaPIP2-2* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36(7):1267-1273
- Hou X W, Hu W, Yan Y, Xu B Y, Jin Z Q. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *MaPIP2-2* gene in banana [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(7):1267-1273 (in Chinese)
- [21] Li G S, Han J L, Yi C, Luo H, Wang Y Z, Wang F P, Wang X Y, Chen L T, Zhang Y L. Global characterization of OsPIP aquaporins reveals that the H_2O_2 transporter OsPIP2; 6 increases resistance to rice blast [J]. *The Crop Journal*, 2024, 12(1):102-109

责任编辑:董金波



第一作者简介:隋娟娟,博士,阜阳师范大学教授,硕士生导师。主要从事百合花药发育及香椿次生代谢产物生成与调控方面的研究。主持国家自然科学基金青年项目1项、安徽省自然科学基金项目1项、安徽省教育厅自然科学研究重点项目2项。在 *Genes*、*Journal of Plant Growth Regulation*、*New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*、*Acta Physiologiae Plantarum*、《南京林业大学学报(自然科学版)》、《华北农学报》等期刊发表论文多篇。